

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



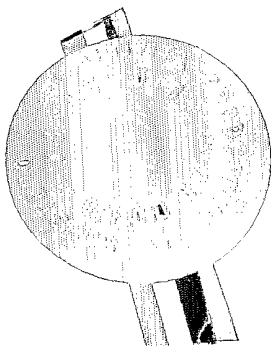
**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2004 A 000103**

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Ad esclusione del Riassunto (pag. 1).

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma li. **23 MAR. 2005**



IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotto

MODULO A (1/2)



AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° **RM 2004 A 000103**

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	Consiglio Nazionale delle Ricerche			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	02118311006
INDIRIZZO COMPLETO	A4	Roma (Italia)			
C. TITOLO	C1	Proteine di fusione comprendenti allergeni della famiglia delle ns-LTPs, loro usi e composizioni farmaceutiche che le comprendono.			

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	GERACI Domenico
NAZIONALITÀ	D2	italiana
COGNOME E NOME	D1	COLOMBO Paolo
NAZIONALITÀ	D2	italiana
COGNOME E NOME	D1	BONURA Angela
NAZIONALITÀ	D2	italiana



	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E. CLASSE PROPOSTA	E1	E2	E3	E4	E5

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 n. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME	I1	
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI
INDIRIZZO	I3	Piazza di Pietra, 39
CAP / LOCALITÀ / PROVINCIA	I4	00186 Roma Tel.: +39 06 695441, fax: +39 06 69544810-20, e-mail: roma@sib.it
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	Lettera d'incarico segue
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	Claudio Germinario (Iscr. Albo n. 989 B) SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI	

MODULO A (2/2)

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORIO 1 ESEMPLARE)	1	0	42
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 1 ESEMPLARE)	1	0	8
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	0	0	

(SI/NO)

LETTERA D'INCARICO

NO

PROCURA GENERALE

NO

RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE

NO

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

ATTESTATI DI VERSAMENTO

Euro

duecentonovantuno/80

DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA
AUTENTICA? (SI/NO)

SI

SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ
AL PUBBLICO (SI/NO)

NO

DATA DI COMPILAZIONE

27/02/2004

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I

Claudio Germinario
(Iscr. Albo n. 989 B)
SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

RM 2004 A 000103

C.C.I.A.A. DI

Roma

COD.

58

IN DATA

27/02/2004

, IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO

LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.

0

FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO

N. ANNOTAZIONI VARIE
DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

[Signature]



L'UFFICIALE ROGANTE

L'Ufficiale Rogante
Vanessa Di Bartolomeo

[Signature]

RM 2004 A 000103

SIB BI3442R

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

" Proteine di fusione comprendenti allergeni della famiglia delle ns-LTPs, loro usi e composizioni farmaceutiche che le comprendono"

a nome di Consiglio Nazionale Delle Ricerche - Roma

DESCRIZIONE

Campo dell'Invenzione

La presente invenzione si colloca nel campo della prevenzione e del trattamento di manifestazioni allergiche associate ad allergeni appartenenti alla famiglia delle proteine di trasferimento aspecifico dei lipidi (ns-LTPs).

Stato della tecnica anteriore

Le proteina ns-LTPs sono piccole molecole proteiche particolarmente stabili di approssimativamente 10 KDa naturalmente presenti in tutti gli organismi vegetali sino ad oggi studiati. Tali proteine sono accomunate dalla capacità di promuovere in vitro il trasferimento non specifico di molecole lipidiche attraverso membrane.

In alcune specie vegetali è stata dimostrata una loro capacità allergenica come nel caso delle Rosaceae Prunoideae (pesca, albicocca, prugna) e Pomoideae (mela), le Urticacee quali la Parietaria.



Il genere *Parietaria* include 5 specie, di cui la più allergenica è la *P. Judaica*.

La reazione allergica, detta anche Ipersensibilità di Tipo I, è indotta da una risposta IgE-mediata ad antigeni ambientali usualmente innocui presenti per esempio nei granuli pollinici. L'interazione IgE/Allergeni è l'evento iniziale di una cascata di reazioni che portano al rilascio dei mediatori, quali l'istamina, responsabili della sintomatologia allergica. Il rilascio di istamina se localizzato a livello cutaneo causa prurito, eritema e edema, mentre se generalizzato provoca bronco costrizione a livello broncopolmonare, e imponenti fenomeni a carico del sistema cardiovascolare.

Le più comuni malattie allergiche sono la rinite, congiuntivite, orticaria, angioedema, eczema, dermatiti, asma e in casi estremi lo shock anafilattico.

La tecnologia del DNA ricombinante ha permesso l'isolamento di vari allergeni della famiglia delle proteine ns-LTPs, tra questi degli allergeni maggiori della *Parietaria* denominati Parj1 e Parj2 (Colombo, P., et al., The allergens of *Parietaria* Int Arch Allergy Immunol. 2003 Mar;130(3):173-9, Review).

Parj1 è una proteina di 176 amino acidi e un peso molecolare di 18.450 Da. La sequenza N-terminale presenta una composizione in amminoacidi caratteristica di sequenze segnale di proteine glicosilate. La proteina matura è composta da 139 amino acidi per un peso molecolare di 14726 Da. È un allergene maggiore poiché lega una percentuale di sieri di soggetti allergici alla *Parietaria judaica* superiore al 90%. (Costa et al. cDNA cloning, expression and primary structure of Parj1, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. FEBS Lett., 1994 Mar 21; 341 (2-3):182-6.)

Parj2 è una proteina di 133 aminoacidi e contiene un peptide segnale di 31 aminoacidi. La proteina matura è di 102 aminoacidi ed ha un peso molecolare di 11344 Da. Esso mostra una omologia del 45% a livello amminoacidico con il Parj1 ed è anch'esso un allergene maggiore poiché reagisce con la quasi totalità dei sieri di soggetti allergici (Duro, G., et al., cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of Parj 2.0101, a new major allergen of the *Parietaria Judaica* pollen. FEBS Lett, 1996. 399(3): p. 295-8).

A dispetto della loro omologia strutturale, Parj1 ed il Parj2 sono in ogni caso due allergeni

indipendenti contenenti epitopi anch'essi indipendenti come posto in evidenza da esperimenti di inibizione crociata. Quando un pool di sieri di soggetti allergici è preincubato con gli allergeni ricombinanti Parj1 e Parj2, il legame delle IgE alla regione 10-14 kDa viene totalmente inibito, suggerendo che solo questi due allergeni sono presenti in questa regione e che insieme sono capaci di inibire la maggioranza delle IgE specifiche rivolte contro gli allergeni della *Parietaria judaica* (Tabella Fig 8).

Gli allergeni Parj1 ed il Parj2 presentano tutte le caratteristiche delle ns-LTP ed è stato possibile determinarne il modello strutturale del Parj1 utilizzando come riferimento il cristallo della ns-LTP del seme di soia. Secondo tale modello, entrambe le molecole presentano 4 ponti disolfuro nell'ordine: 4-52, 14-29, 30-75, 50-91. Tutte le proteine ns-LTP considerate, quando opportunamente allineate come illustrato in figura 2 della domanda WO-A-02/20790, contengono quattro ponti disolfuro tra residui di cisteina in posizioni corrispondenti alle sopra indicate posizioni di Parj1 o Parj2.

Applicando una strategia di mutagenesi sito specifica, è stata precedentemente dimostrata

l'importanza dei ponti disolfuro nella formazione degli epitopi IgE (WO-A-02/20790) e l'esistenza di un epitopo dominante nella regione loop1 compresa tra gli amminoacidi 1 e 30. (Colombo, P., et al., Identification of an immunodominant IgE epitope of the Parietaria Judaica major allergen. J. Immunol, 1998. 160(6): p. 2780-5).

Dal punto di vista terapeutico, esistono vari trattamenti farmacologici della sintomatologia dell'allergia, mentre l'unica terapia preventiva è rappresentata dall'immunoterapia specifica (SIT). Questa terapia prevede la somministrazione di quantità diluite dell'allergene per via sottocutanea al paziente in maniera tale da sopprimere la reazione specifica nei confronti dell'allergene. Tuttavia, la maggior parte degli estratti proteici usati in commercio nella SIT, sono in ogni caso degli estratti crudi, miscele di numerosi componenti in cui una precisa standardizzazione della componente allergenica è difficile. Tale strategia può comportare la somministrazione di componenti allergenici cui il paziente non è sensibile, inducendo così la produzione di IgE specifiche verso ulteriori componenti l'estratto. In aggiunta, la



somministrazione dell'allergene in toto presenta il rischio di effetti collaterali che possono giungere fino allo shock anafilattico. Per eliminare alcuni degli svantaggi appena descritti, sono state sviluppate molecole alternative con ridotti effetti collaterali, capaci cioè di non interagire con le IgE, tuttavia mantenendo la capacità di immunosopprimere la risposta T attraverso stimolazione di immunoglobuline tipi IgG.

In questa ottica si pone il precedente lavoro dei presenti autori oggetto della domanda WO-A-02/20790. Attraverso manipolazione genetica, sono state prodotte forme varianti, o muteine, di allergeni tipo ns-LTP caratterizzate dalla parziale o totale eliminazione dei ponti disolfuro tipici della proteina selvatica. Tali muteine presentano ridotta attività allergenica con caratteristiche tali da renderle utilizzabili in immuno terapia specifica (SIT) come molecole sostitutive delle proteine native.

Resta tuttavia la necessità di disporre di nuove molecole che sappiano coniugare le caratteristiche di ridotta allergenicità ed alta efficacia immunoterapeutica con quelle di facile accessibilità

sia sotto il profilo della loro preparazione che del loro uso.

Scopo della presente invenzione è quello di soddisfare tale necessità. Sommario della invenzione

Studi epidemiologici hanno dimostrato che soggetti genericamente allergici a varie piante appartenenti allo stesso genere, o alla stessa specie, o anche ad una sola particolare varietà di pianta presentano nella maggior parte dei casi IgE rivolte contro più allergeni prodotti dalla pianta. Per esempio nel caso di soggetti allergici alla *Parietaria judaica*, questi normalmente presentano IgE rivolte contro entrambi gli allergeni maggiori, vale a dire le proteine Parj1 e Parj2. Come evidenziato in Figura 8 (Tabella), in un saggio di inibizione di legame tra le IgE umane in sieri di pazienti allergici ed un estratto di *P. judaica*, la percentuale di inibizione indotta della miscela di Parj1 e Parj2 selvatici è normalmente superiore a quella indotta dai singoli allergeni. Pertanto una qualunque formulazione terapeutica idonea al trattamento dell'allergia dovrebbe comprendere tutti i principali allergeni, o loro muteine, prodotti da una o più piante responsabili dell'allergia.

La presente invenzione si basa sulla inattesa scoperta che proteine ibride ottenuta dalla fusione delle sequenze polipeptidiche di più allergeni in forma mutata, presentano caratteristiche vantaggiose dal punto di vista sia terapeutico che preparativo, così come sotto il profilo della gestione del medicamento rispetto a semplici miscele di più allergeni.

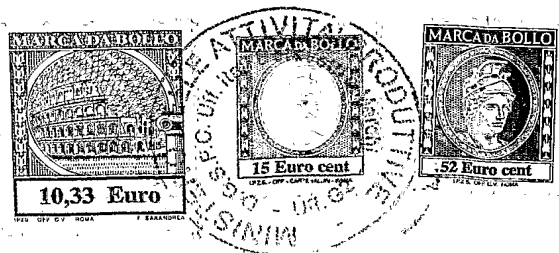
L'oggetto principale della presente invenzione è rappresentato da proteine di fusione comprendenti sequenze amino acidiche di allergeni differenti appartenenti alla famiglia delle proteine ns-LTPs, in cui tali sequenze sono prive di uno o più dei quattro ponti disolfuro presenti nella sequenza degli allergene in forma selvatica, in particolare prive di almeno un ponte disolfuro nella regione ammino terminale compresa tra i residui d'amino acidi 1 e 30. La sequenza amminoacidica di ognuno degli allergeni è indipendentemente mutata per eliminazione o per sostituzione di uno o più residui di cisteina coinvolti nella formazione di un ponte disolfuro, pur mantenendo essenzialmente la stessa lunghezza delle sequenze degli allergeni in forma selvatica. Gli allergeni dell'invenzione sono prodotti da piante appartenenti allo stesso genere, ovvero alla

stessa specie, ovvero preferibilmente alla stessa varietà vegetale. In una forma di realizzazione preferita la proteina di fusione è una proteina eterodimera che comprende le sequenze amino acidiche di due differenti allergeni, per esempio allergeni di una stessa pianta quale gli allergeni Parj1 e Parj2 della specie *Parietaria Judaica*.

In questo caso le sequenze amino acidiche degli allergeni Parj1 e Parj2 saranno ambedue indipendentemente modificate per sostituzione di residui di cisteina con residui incapaci di generare un ponte disolfuro nelle posizioni 29 e 30 ovvero 4, 29 e 30 ovvero 29, 30, 50, 52.

Ulteriori oggetti dell'invenzione sono una sequenza nucleotidica comprendente il DNA codificante la proteina di fusione dell'invenzione. Un sistema d'espressione o di clonaggio comprendente la sequenza nucleotidica in oggetto affiancato da opportune sequenze di controllo, promozione e regolazione dell'espressione, e una cellula ospite trasformata per mezzo di tale sistema di espressione o di clonaggio.

Altri oggetti dell'invenzione sono rappresentati dalle applicazioni mediche della proteina di fusione, in particolare come agente immunologico



ipoallergenico nel trattamento di allergie in immunoterapia specifica (SIT), così come le composizioni farmaceutiche comprendenti la proteina di fusione ed un eccipiente farmacologicamente accettabile.

Metodi di preparazione della proteina di fusione in cui sequenze ammino acidiche opportunamente mutate di allergeni differenti sono prodotte e legate direttamente o attraverso uno spaziatore per sintesi chimica o per espressione, in forma di proteina di fusione, in cellule ospiti geneticamente modificate formano ulteriore oggetti dell'invenzione, così come metodi di preparazione delle composizioni farmaceutiche.

Le molecole di fusione secondo l'invenzione offrono indiscussi vantaggi. Innanzi tutto mostrano una capacità di interagire con le IgE, quindi stimolandole, decisamente minore rispetto ai singoli allergeni modificati, come è evidente dal confronto della fig. 5 con la tabella I della domanda anteriore WO-A-02/20790, rispetto ai singoli allergeni o miscele di allergeni selvatici, come è evidente dal confronto della la Fig. 5 con la figure 8 o rispetto all'eterodimero di allergeni selvatici, come è illustrato nuovamente dalla fig. 5. Questa diminuita

allergenicità è vantaggiosamente accompagnata da un'inalterata capacità immunogenica come dimostrato in Fig 7. Non soltanto la diminuzione delle caratteristiche allergeniche dell'eterodimero, rispetto ai singoli allergeni mutati o loro miscela, non era prevedibile, ma già il semplice mantenimento da parte della proteina ibrida delle caratteristiche tipiche del singolo allergene modificato non era caratteristica prevedibile in alcun modo.

Inoltre, rispetto alla semplice miscela d'allergeni o di loro muteine, gli eterodimeri dell'invenzione presentano l'ulteriore vantaggio di poter essere prodotti attraverso un procedimento unico, che ovviamente offre la semplificazione di tutte le procedure di produzione, di controllo, di stoccaggio, di autorizzazione alla vendita e all'uso, con un indiscutibile risparmio di tempi e di mezzi materiali ed finanziari.

Breve descrizione delle figure

Figura 1: Sequenza nucleotidica del dimeri Parj2-Parj1 nella sua forma mutata sui residui in posizione 10, 85, 88, 122, 397 e 400. In tutte le posizioni indicate il nucleotide T è stato sostituito dal nucleotide A (in grassetto). Lo spaziatore "GGATTC" tra le sequenze codificanti i due allergeni Parj2 e

Parj1 è evidenziato anch'esso in grassetto (SEQ ID NO:3)

Figura 2: Sequenza amminoacidica dell'eterodimero Parj2-Parj1 nella sua forma mutata nei residui in posizione 4, 29 e 30 in ognuna delle due molecole. La sequenza amminoacidica è espressa utilizzando il codice ad una lettera. Gli aminoacidi sottolineati indicano le sostituzioni effettuate. Gli aminoacidi in grassetto e corsivo indicano gli aminoacidi glicina e fenilalanina introdotti con il clonaggio. (SEQ ID NO 4)

Figura 3: Determinazione ELISA della capacità di legame dell' allergene Parj2 comparati all'attività di legame del mutante Parj2/4,29,30. Le linee con quadrati neri indicano i sieri di soggetti allergici alla Pj, la linea con quadrati bianchi indica un siero di paziente non allergico alla Pj .

Figura 4: Pannello A: rappresentazione schematica del mutante PjEDcys. Pannello B: Analisi Western blot effettuata utilizzando le proteine ricombinanti Parj1 (linea A), Parj2 (linea B), dimero Parj2-Parj1 (clone dimero w.t.) (linea C), PjEDcys (lineaD) con un siero di soggetto allergico alla *Parietaria judaica*. Pannello C: la stessa

membrana del Pannello B incubata con una sonda specifica per la coda di istidina.

Figura 5: Determinazione dell'inibizione ELISA da parte delle proteine ricombinanti dimero selvatico (w.t.) e PjEDcys utilizzando l'estratto crudo di *Parietaria judaica* come antigene e 5 sieri da soggetti allergici alla Pj.

Figura 6: Test di rilascio di istamina da sangue di pazienti allergici alla Pj. Gli antigeni utilizzati sono: una miscela equimolare dei due allergeni rParj1 e rPar2 (linea con rombi denominata rPj1+rPj2) ed il mutante PjEDcys (linea con quadrati). In ascisse vengono espresse le quantità di proteina utilizzata, in ordinata la percentuale di istamina rilasciata rispetto alla percentuale di istamina totale dei mastociti del paziente.

Figura 7: Analisi citofluorimetrica della proliferazione delle cellule CD3+ da PBMC di un paziente allergico alla Pj. Pannello A: stimolazione senza antigene; Pannello B: stimolazione indotta da rParj1 ad una concentrazione di 10 mg/ml; Pannello C: stimolazione indotta utilizzando la proteina ricombinante PjEDcys ad una concentrazione di 2 ug/ml; Pannello D: stimolazione indotta utilizzando



la proteina ricombinante PjEDcys ad una concentrazione di 10 mg/ml. I valori numerici indicano le percentuali relative degli eventi proliferativi rispetto al numero di eventi totali misurati.

Figura 8: La tabella riporta i risultati di un test ELISA di inibizione del legame con la IgE umane da parte di allergeni w.t. singoli o loro miscela.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Le sequenze peptidiche di allergeni selvatici ns-LTP prodotti da varie piante, quali la Parietaria judaica (Parj1 e Parj2), soia, lyces, ricco, tabacco, orysa, mais, spiol e grano sono riportate nella domanda di brevetto WO-A-02/20790. Tutte le molecole presentano quattro ponti disolfuro tra otto residui di cisteina in posizioni altamente conservative corrispondenti, quando opportunamente allineate, alle posizioni 4, 14, 29, 30 50, 52, 75 e 91, delle molecole Parj1 e Parj2. I residui di cisteina coinvolti in ponti disolfuro sono gli accoppiamenti 4-51, 14-29, 30-75 e 50-91.

Muteine di questi allergeni con diminuita capacità di formare ponti disolfuro sono molecole in cui uno o più residui di cisteina coinvolti nel legame -SS- sono stati eliminati o sostituiti con altri residui

incapaci di partecipare al legame, ma senza alterare stericamente la conformazione spaziale della molecola, per esempio Asn, Ser, Thr, Ile, Met, Gly, Ala, Val, Gln o Leu. Muteine preferite sono ottenute per eliminazione di due, tre o quattro ponti disolfuro; per esempio quelli corrispondenti ai legami 14-29 e/o 30-75 e/o 4-51 e/o 50-91 della molecola di Parj1 o Parj2. Molecole mutate per sostituzione del residuo di cisteina con un residuo di serina o alanina nelle posizioni 29, 30, oppure 4, 29, 30 oppure, 29, 30, 50, 52 di Parj1 o Parj2, ovvero nelle corrispondenti posizioni degli altri allergeni ns-LTPs, presentano le migliori proprietà di bassa allergenicità. Al di là di queste, le muteine utilizzate nell'invenzione non presentano altre modificazioni, e mantengono quindi essenzialmente inalterata la sequenza, la lunghezza ed il peso molecolare dell'allergene selvatico.

Le sequenze polinucleotidiche codificanti vari allergeni selvatici della famiglia delle ns-LTPs sono disponibili al pubblico in banche dati quali EMBL, o descritte nello stato della tecnica. In particolare le sequenze nucleotidiche degli allergeni di *Parietaria judaica* sono descritte nel

già citato WO-A-02/20790 e in Duro, G., et al FEBS Letter 1996 (sopra).

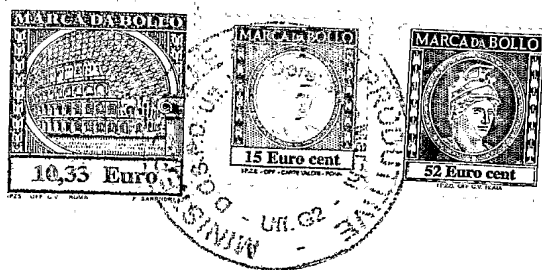
La preparazioni delle muteine dell'invenzione avviene attraverso qualsiasi metodo noto idoneo all'introduzione di variazioni su singoli residui amino acidici lungo la sequenza polipeptidica di proteine. Normalmente la variazione è condotta attraverso mutazione puntiforme sito-specifica a livello di sequenza nucleotidica codificante mediante il metodo della polimerizzazione a catena del DNA (PCR) ed utilizzando opportuni oligonucleotidi sintetici. Le procedure sono descritte per esempio nella precedente domanda WO-A-02/20790.

Le proteine di fusione dell'invenzione contengono le sequenze amino acidiche opportunamente mutate, di allergeni ottenuti dalla stessa famiglia vegetale, per esempio da fagacee, urticacee, oliacee, composite o graminacee; o dallo stesso genere, per esempio *Parietaria*; o dalla stessa specie, per esempio *P. judaica*, *officinalis* o *lusitanica*; o meglio ancora dalla stessa varietà di pianta. Proteine di fusione preferite sono quelle comprendenti muteine degli allergeni principale della *Parietaria judaica*, vale a dire Parj1 e Parj2 o loro isoforme note e depositate e.g. in EMBL. Le due proteine legate in un

eterodimero possono essere modificate secondo lo stesso schema, o secondo schemi differenti. In tal senso, le due proteine potranno contenere ponti disolfuro in numero e/o in posizione differenti l'uno dall'altro. Forme di realizzazione preferite dell'invenzione prevedono allergeni singolarmente ed indipendentemente mutati in una o più delle posizioni corrispondenti alle posizioni 4, 29 e 30 della sequenza ammino acidica degli allergeni maggiori della *P. judaica*. La proteina di fusione dell'invenzione contiene, per esempio, gli allergeni Parj1 e Parj2 modificati ambedue nelle posizioni 29 e 30 ovvero 4, 29 e 30 ovvero 29, 30, 50, 52.

La preparazione della molecola ibrida avviene per fusione delle due parti proteiche corrispondenti ai due allergeni. Benché la formazione per sintesi di un legame chimico diretto, per esempio peptidico, tra i residui N-terminale e C-terminale delle due parti sia possibile, il metodo utilizzato preferibilmente implica la costruzione di una molecola polinucleotidica codificante le proteine allergeniche in forma fusa ed opportunamente mutate nelle posizioni desiderate (SEQ ID NO:1).

Le due parti di cui si compone l'eterodimero risultante possono essere legate direttamente o



possono essere separate da uno o più residui d'amino acidi. Secondo uno schema ben noto all'esperto del settore ed illustrato dettagliatamente negli esempi, cloni contenenti il materiale codificante le singole proteine allergeniche opportunamente mutate sono amplificati, digeriti con enzimi di restrizione ed i frammenti codificanti legati ed integrati in vettori d'espressione. Per facilitarne la purificazione, la proteina ibrida può opzionalmente essere espressa come proteina di fusione con una molecola legante che abbia un'affinità specifica per una determinata molecola partner; per esempio con una coda di istidina nella regione amminoterminale che permetterà la purificazione su colonna tipo His-trap.

I sistemi di clonaggio e di espressione utilizzati per la preparazione della proteina di fusione possono essere vettori idonei a cellule procariotiche o eucariotiche, per esempio il vettore procariotico commerciale pQE30.

Composizioni farmaceutiche idonee alla somministrazione delle molecole dell'invenzione sono composizioni in forma di soluzioni acquose, idro-alcoliche o oleose, in forma di emulsioni o di sospensioni, in mezzo acquoso o oleoso, o in forma di sospensioni liposomali. Vantaggiosamente la

composizione è formulata per ottenere un rilascio ritardato nel tempo. A questo fine, mezzi oleosi o mezzi contenenti opportuni agenti addensanti possono essere utilizzati. Oltre alle descritte formulazioni in forma liquida, le composizioni dell'invenzione possono essere in forma semisolida quali creme, pomate, gel o altre forme idonee all'applicazione topica. Impianti per applicazione sottocute finalizzati ad un rilascio prolungato nel tempo sono altresì utilizzabili. In questo caso le molecole dell'invenzione sono inglobate in una matrice polimerica biodegradabile o biodispersibile sotto l'azione del sistema enzimatico naturale del paziente. A questo scopo si utilizzeranno polimeri quali polilattato o poliglicolato o copolimeri polilattato/glicolato.

Le composizioni in oggetto sono formulate per somministrazione parenterale, ad uso sottocutaneo, intramuscolare o intravenoso o per una somministrazione topica su cute o su mucose o per amministrazione orale.

Le molecole di fusione dell'invenzione sono caratterizzate da una marcata ipoallergenicità rispetto ai singoli allergeni monomeri (figura 4, pannello B e C) o rispetto ad una molecola

eterodimera composta dagli allergeni in forma selvatica (w.t.) (figura 5).

Le molecole ipoallergeniche dell'invenzione trovano valida applicazione come medicinali nel trattamento preventivo e curativo delle allergie causate da più allergeni di piante. In particolare come agenti desensibilizzanti o immunosoppressivi a ridotta attività anafilattica in trattamenti di immunoterapia specifica (SIT). Esempi di malattie allergiche che possono essere trattate con le proteina di fusione dell'invenzione sono la rinite, congiuntivite, orticaria, angioedema, aczema, dermatiti, asma, shock anafilattico.

Vengono di seguito descritte le caratteristiche immunologiche di una specifica molecola eterodimerica formata dalla fusione della sequenza del Par1 e del Parj2 e mutata nelle rispettive posizioni 4, 29 e 30 (PjEDcys). In particolare, tale proteina è stata generata attraverso la fusione genetica dei due polipeptidi secondo l'ordine Parj2/4,29,30-Par1/4,29,30. L'evento di fusione ha causato l'inserzione di due ulteriori aminoacidi (G ed F) che non interferiscono con la corretta fase di lettura (Fig.2 e 4 pannello A). Tale proteina di fusione è stata prodotta e

purificata utilizzando un sistema d'espressione procariotico commerciali (sistema di espressione di proteine di fusione pQE30, QIAGEN). La figura 4 pannello B mostra una analisi Western-blot dalla quale si evince che la molecola dimerica mutata presenta un ridotta allergenicità (linea D) se paragonata all'attività di legame dei singoli monomeri (linee A e B) o ad una molecola dimerica composta dagli allergeni Parj1 e Parj2 wild-type (linea C). Ciò dimostra che tanto l'evento di fusione che la mutazione introdotta contribuiscono all'ottenimento della descritta ipoallergenicità. Tale dato non è ascrivibile ad una diversa quantità di proteina caricata sul gel come dimostrato dal pannello C dove è stata utilizzata una sonda specifica per le code di istidina. La ridotta capacità di legame è stata poi dimostrata con una tecnica indipendente dalla precedente dove la molecola eterodimerica PjEDcys è stata saggiata per la sua capacità di inibire il legame delle IgE umane verso un estratto crudo di Parietaria. La fig. 5 infatti mostra come tale molecola inibisca il legame delle IgE di 5 pazienti allergici con un valore compreso tra il 3,5 ed il 10% ed in ogni caso con valori estremamente più bassi rispetto ad



una costruzione dimerica contenente gli allergeni Parj1 e Parj2 nella loro forma nativa (clone dimero w.t.).

L'effetto di ridotta capacità di legame è stato poi dimostrato in un saggio di rilascio di istamina effettuato su sangue periferico di pazienti allergici. I dati riportati in Fig.6 mostrano le percentuali di rilascio di istamina dell'eterodimero PjEDcys in rapporto alle percentuali di rilascio di una miscela equimolare dei monomeri Parj1 e Parj2 wild-type. In tutti i pazienti studiati (N=4) la molecola mutata esibisce una spiccata riduzione dell'attività anafilattica.

Tali variazioni a livello strutturale non interferiscono comunque con la capacità immunogenica della molecola. In Fig. 7 è riportato infatti il grafico di proliferazione cellulare ottenuto incubando PBMC purificati da sangue di un soggetto allergico e dopo stimolazione con il clone PjEDcys e con le molecole wild-type come controllo. In questo soggetto, le mutazioni a carico delle cisteina non hanno alcun effetto sul processamento e sul riconoscimento dell'allergene da parte delle cellule del T del sangue.

L'invenzione è di seguito illustrata a mezzo di esempi specifici riguardanti le fasi sperimentali della preparazione e della valutazione delle proprietà immunologiche della molecola di fusione Parj2/4,29,30-Par1/4,29,30. Tali esempi hanno scopo puramente illustrativo, ed in nessun modo limitativo sull'invenzione.

Esempio 1: Costruzione di una molecola contenente l'informazione genetica per il parj2 mutata nelle cisteine 4, 29 e 30 (clone Parj2/4,29,30).

La mutagenesi sito-specifica a carico dei residui di cisteina in posizione 29 e 30 è stata effettuata utilizzando il kit Transformer site-Directed Mutagenesis della Clontech seguendo le indicazioni del produttore ed utilizzando l'oligonucleotide sintetico Pj2/29-30 5' GAG AGC AGC AGC GGC AGC 3' (SEQ ID NO 5). Il clone in grado di esprimere il Parj2 wild-type è stato utilizzato come stampo per la mutagenesi ed i residui di cisteina in posizione 29 e 30 sono stati trasformati in serina (clone Parj2/29-30). La riuscita del procedimento è stata confermata dal sequenziamento dei cloni ricombinanti utilizzando il metodo di Sanger. La mutagenesi del residuo di cisteina in posizione 4 in serina è stata ottenuta mediante

polimerizzazione a catena del DNA (PCR) utilizzando gli oligonucleotidi sintetici Pj2/4 5' GTG GGA TCC GAG GAG GCT AGC GGG AAA GTG 3' (SEQ ID NO 6) e Pj2 reverse 5' GGG GGA TCC ATA GTA ACC TCT GAA 3' (SEQ ID NO 7) ed utilizzando il clone Parj2/29-30 come stampo. Il frammento di DNA così ottenuto è stato clonato nel vettore di espressione pQE30 (Qiagen). L'analisi della sequenza nucleotidica del clone ricombinante ha dimostrato l'avvenuta sostituzione (vedi Fig.1).

Esempio 2: Costruzione di una molecola dimerica contenente l'informazione genetica per il parj1 e parj2 mutati nelle cisteine 4, 29 e 30.

La molecola dimerica costituita dagli allergeni Par1 e Parj2 mutati rispettivamente nelle posizioni Cys4, Cys29 e Cys30 è stata ottenuta mediante una serie di processi di amplificazione del DNA.

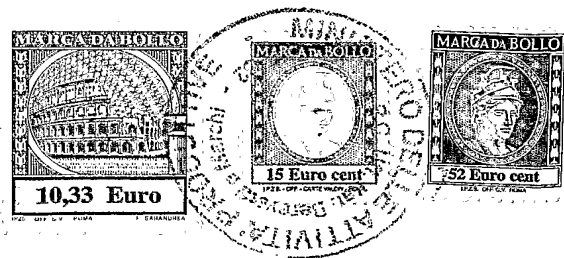
Il clone Parj1 mutato nelle cisteine in posizione Cys4, Cys29 e Cys30 descritto nel brevetto n. WO 02/20790 (clone 29-30) è stato digerito con l'enzima di restrizione BamH1.

Il frammento contenente l'informazione genetica per il Parj2 mutato nelle posizioni Cys4, 29 e 30 (clone Parj2/4,29,30) è stato soggetto ad un processo di amplificazione del DNA utilizzando gli

oligonucleotidi Pj2/4 e Pj2 reverse. Il frammento così generato è stato purificato mediante gel di agarosio, digerito con l'enzima di restrizione BamH1 ed incubato con una miscela contenente l'enzima DNA ligase ed il clone Parj 1 (29-30) precedentemente linearizzato. I cloni ricombinanti sono stati purificati e la loro sequenza nucleotidica determinata con il metodo di Sanger. La proteina ibrida così costruita è stata espressa come proteina di fusione con una coda di istidina nella regione amminoterminale per permettere la purificazione della stessa (clone PjEDcys) su colonna di affinità. (vedi Fig.2 e Fig.4 pannello A).

Esempio 3: Induzione e purificazione delle proteine ricombinanti.

10 ml della coltura Over/Night sono utilizzati per un inoculo in 400 ml di terreno di coltura 2YT contenente ampicillina e kanamicina ad una concentrazione finale di 100 ug/ml e 10 ug/ml rispettivamente. La crescita avviene a 37°C e in agitazione. Dopo due ore alla coltura viene quindi aggiunto IPTG alla concentrazione finale 1 mM e la crescita prosegue per ulteriori 4 ore a 37°C in agitazione. Alla fine di questo periodo, la coltura batterica è centrifugata a 5000 rpm per 15 minuti.



Il pellet è risospeso in 5 ml/grammo di Start buffer (10mM Nafosfato pH7,4 e 6 M UREA) e le cellule vengono distrutte utilizzando un sonificatore. Le proteine ricombinanti sono state poi definitivamente purificate utilizzando una colonna del tipo His Trap (Amersham) seguendo le istruzioni della casa fornitrice. Le frazioni eluite sono state analizzate su gel di poliacrilammide al 16% e le frazioni contenenti la proteina ricombinante sono state valutate quantitativamente allo spettrofotometro dopo colorazione con il metodo di Bradford. Infine le proteine sono state desalate utilizzando una colonna di Sephadex G-25 (Pharmacia).

Esempio 4: Saggio ELISA per la valutazione della percentuale di inibizione del legame con le IgE.

La determinazione del test ELISA è stata effettuata come descritto nel lavoro Bonura et al. Hypoallergenic variants of the Parietaria judaica major allergen Par j 1: a member of the non-specific lipid transfer protein plant family Int Arch Allergy Immunol. 2001 Sep;126 (1):32-40.). La concentrazione dell'antigene utilizzato in ogni pozzetto è di 5 µg/ml. I pazienti utilizzati (n=5) presentavano una chiara storia di allergia alla

Parietaria judaica e tutti mostravano positività allo skin test utilizzando prodotti commerciali.

Esempio 5: Saggio di rilascio di istamina

Il saggio di rilascio di istamina è stato effettuato utilizzando sangue eparinizzato da soggetti allergici alla *Parietaria judaica* ed utilizzando una scala di concentrazione di allergene compresa tra 0,0001 e 1 µg/ml. Il protocollo di rilascio è stato effettuato come già precedentemente descritto (Colombo, P., et al., Identification of an immunodominant IgE epitope of the *Parietaria Judaica* major allergen. J. Immunol, 1998. 160(6): p. 2780-5).

Esempio 6: Studio della Proliferazione Cellulare indotta da PjEDcys

La marcatura con 5(6)-CFDA-SE (Carboxy-Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) è stata effettuata come descritto nei lavori presentati come referenze.

Brevemente, PBMC di pazienti allergici a *Parietaria judaica* sono risospesi in PBS 1x pH 7.2 (1×10^7 /ml) e marcati con (5(6) CFDA-SE (Molecular Probes) ad una concentrazione finale di 5 µM per 5 minuti, a temperatura ambiente ed al buio. Le cellule sono risospese in RPMI completo

(10% di siero AB), e stimulate per 10-12 giorni con 2 e 10 µg/ml di:

- mix rParj1/ rParj2 ,
- PjEDcys.

I PBMC sono quindi marcati con anti-CD3 PE (Caltag), ed analizzati in citofluorimetria (FACSCalibur - BD) I dati sono infine valutati utilizzando il programma WinMDI 2.8.

LISTE DI SEQUENZE

<110> Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biomedicina
e Immunologia Molecolare

<120> Proteine di fusione

<130> BI3442R

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 732

<212> DNA

<213> Parietaria judaica

<222> (1)..(729)

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(12); (40)..(42); (85)..(90); (148)..(150); (154)..(156);
(271)..(273); (322)..(324); (352)..(354); (397)..(402); (460)..(462);
(466)..(468); (535)..(537); (583)..(585)

<223> n è a, c, g, o t

<400> 1

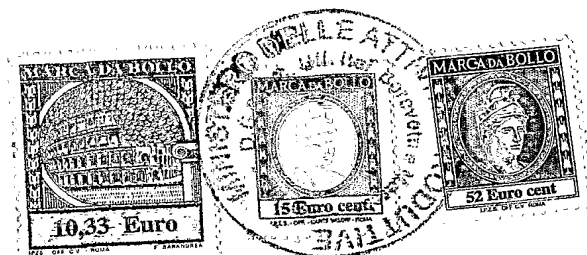
gag gag gct nnn ggg aaa gtg gtg cag gat ata atg ccg nnn ctg cat 48
Glu Glu Ala Xaa Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Xaa Leu His
1 5 10 15

ttc gtg aag ggg gag gag aag gag ccg tgc aag gag nnn nnn agc ggc 96
Phe Val Lys Gly Glu Lys Glu Lys Pro Ser Lys Glu Xaa Xaa Ser Gly
20 25 30

acg aag aag ctg agc gag gag gtg aag acg acg gag cag aag agg gag 144
Thr Lys Lys Leu Ser Glu Glu Val Lys Thr Thr Glu Gln Lys Arg Glu
35 40 45

gcc nnn aag nnn ata gtg cgc gcc acg aag ggc atc tcc ggt atc aaa 192
Ala Xaa Lys Xaa Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys
50 55 60

aat gaa ctt gtc gcc gag gtc ccc aag aag nnn gat att aag acc act 240
Asn Glu Leu Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Xaa Asp Ile Lys Thr Thr



65	70	75	80	
ctc ccg ccc atc acc gcc gac ttc gac tgc nnn aag atc caa agt act				288
Leu Pro Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Xaa Lys Ile Gln Ser Thr				
	85	90	95	
att ttc aga ggt tac tat gga ttc caa gaa acc nnn ggg act atg gtg				336
Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr Gly Phe Gln Glu Thr Xaa Gly Thr Met Val				
	100	105	110	
aga gcg ctg atg ccg nnn ctg ccg ttc gtg cag ggg aaa gag aaa gag				384
Arg Ala Leu Met Pro Xaa Leu Pro Phe Val Gln Gly Lys Glu Lys Glu				
	115	120	125	
ccg tca aag ggg nnn nnn agc ggc gcc aaa aga ttg gac ggg gag acg				432
Pro Ser Lys Gly Xaa Xaa Ser Gly Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr				
	130	135	140	
aag acg ggg ccg cag agg gtg cac gct nnn gag nnn atc cag acc gcc				480
Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His Ala Xaa Glu Xaa Ile Gln Thr Ala				
	145	150	155	160
atg aag act tat tcc gac atc gac ggg aaa ctc gtc agc gag gtc ccc				528
Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro				
	165	170	175	
aag cac nnn ggc atc gtt gac agc aag ctc ccg ccc att gac gtc aac				576
Lys His Xaa Gly Ile Val Asp Ser Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn				
	180	185	190	
atg gac nnn aag aca gtt gga gtg gtt cct cgg caa ccc caa ctt cca				624
Met Asp Xaa Lys Thr Val Gly Val Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro				
	195	200	205	
gtc tct ctc cgt cat ggt ccc gtc acg ggc cca agt gat ccc gcc cac				672
Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His				
	210	215	220	
aaa gca cgg ttg gag aga ccc cag att aga gtt ccg ccc ccc gca ccg				720
Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro				
	225	230	235	240
gaa aaa gcc taa				732
Glu Lys Ala				

<210> 2
<211> 243
<212> Proteina
<213> Parietaria judaica

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Lo 'Xaa' in posizione 4, 14, 29, 30, 50, 52, 75, 91, 108, 118, 133, 154, 156, 179, 195 è Asn, Ser, Thr, Ile, Met, Gly, Ala, Val, Gln o Leu.

<400> 2

Glu Glu Ala Xaa Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Xaa Leu His
1 5 10 15

Phe Val Lys Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu Xaa Xaa Ser Gly
20 25 30

Thr Lys Lys Leu Ser Glu Glu Val Lys Thr Thr Glu Gln Lys Arg Glu
35 40 45

Ala Xaa Lys Xaa Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys
50 55 60

Asn Glu Leu Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Xaa Asp Ile Lys Thr Thr
65 70 75 80

Leu Pro Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Xaa Lys Ile Gln Ser Thr
85 90 95

Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr Gly Phe Gln Glu Thr Xaa Gly Thr Met Val
100 105 110

Arg Ala Leu Met Pro Xaa Leu Pro Phe Val Gln Gly Lys Glu Lys Glu
115 120 125

Pro Ser Lys Gly Xaa Xaa Ser Gly Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr
130 135 140

Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His Ala Xaa Glu Xaa Ile Gln Thr Ala
145 150 155 160

Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro
165 170 175

Lys His Xaa Gly Ile Val Asp Ser Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn
180 185 190

Met Asp Xaa Lys Thr Val Gly Val Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro
195 200 205

Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His
210 215 220

Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Lys Ala

<210> 3
<211> 732
<212> DNA
<213> Parietaria judaica
<221> Sequenza codificante
<222> (1)..(729)

<400> 3

gag gag gct agc ggg aaa gtg gtg cag gat ata atg ccg tgc ctg cat 48
Glu Glu Ala Ser Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu His
1 5 10 15

ttc gtg aag ggg gag gag aag gag ccg tgc aag gag agc agc agc ggc 96
Phe Val Lys Gly Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu Ser Ser Ser Gly
20 25 30

acg aag aag ctg agc gag gag gtg aag acg acg gag cag aag agg gag 144
Thr Lys Lys Leu Ser Glu Glu Val Lys Thr Thr Glu Gln Lys Arg Glu
35 40 45

gcc tgc aag tgc ata gtg cgc gcc acg aag ggc atc tcc ggt atc aaa 192
Ala Cys Lys Cys Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys
50 55 60

aat gaa ctt gtc gcc gag gtc ccc aag aag tgc gat att aag acc act 240

Asn Glu Leu Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr
65 70 75 80

ctc ccg ccc atc acc gcc gac ttc gac tgc tcc aag atc caa agt act 288
Leu Pro Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr
85 90 95

att ttc aga ggt tac tat gga ttc caa gaa acc agc ggg act atg gtg 336
Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr Gly Phe Gln Glu Thr Ser Gly Thr Met Val
100 105 110

aga gcg ctg atg ccg tgc ctg ccg ttc gtg cag ggg aaa gag aaa gag 384
Arg Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro Phe Val Gln Gly Lys Glu Lys Glu
115 120 125

ccg tca aag ggg agc agc agc ggc gcc aaa aga ttg gac ggg gag acg 432
Pro Ser Lys Gly Ser Ser Ser Gly Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr
130 135 140

aag acg ggg ccg cag agg gtg cac gct tgt gag tgc atc cag acc gcc 480
Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His Ala Cys Glu Cys Ile Gln Thr Ala
145 150 155 160

atg aag act tat tcc gac atc gac ggg aaa ctc gtc agc gag gtc ccc 528
Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro
165 170 175

aag cac tgc ggc atc gtt gac agc aag ctc ccg ccc att gac gtc aac 576
Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn
180 185 190

atg gac tgc aag aca gtt gga gtg gtt cct cgg caa ccc caa ctt cca 624
Met Asp Cys Lys Thr Val Gly Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro
195 200 205

gtc tct ctc cgt cat ggt ccc gtc acg ggc cca agt gat ccc gcc cac 672
Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His
210 215 220

aaa gca cgg ttg gag aga ccc cag att aga gtt ccg ccc ccc gca ccg 720
Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro
225 230 235 240

gaa aaa gcc taa
Glu Lys Ala

732



<210> 4
<211> 243
<212> Proteina
<213> Parietaria judaica

<400> 4

Glu Glu Ala Ser Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu His
1 5 10 15
Phe Val Lys Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu Ser Ser Ser Gly
20 25 30
Thr Lys Lys Leu Ser Glu Glu Val Lys Thr Thr Glu Gln Lys Arg Glu
35 40 45
Ala Cys Lys Cys Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys
50 55 60
Asn Glu Leu Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr
65 70 75 80
Leu Pro Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr
85 90 95
Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr Gly Phe Gln Glu Thr Ser Gly Thr Met Val
100 105 110
Arg Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro Phe Val Gln Gly Lys Glu Lys Glu
115 120 125
Pro Ser Lys Gly Ser Ser Ser Gly Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr
130 135 140
Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His Ala Cys Glu Cys Ile Gln Thr Ala
145 150 155 160
Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro
165 170 175
Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn
180 185 190
Met Asp Cys Lys Thr Val Gly Val Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro
195 200 205

Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His
210 215 220

Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Lys Ala

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> primer senso per l'inserzione delle mutazioni in posizione 29
e 30

<400> 5
gagagcagca gcggcagc 18

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> primer senso per l'inserzione della mutazione in posizione 4

<400> 6
gtgggatccg aggaggctag cgggaaagtg 30

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer antisenso parj2

<400> 7
gggggatcca tagtaacctc tgaa

Dott. Claudio Germinario
(Iscr. Albo n° 989 B)

C. Germinario



HM 2004 A 000103

RIVENDICAZIONI

1. Proteina di fusione caratterizzata dal fatto che comprende le sequenze amino acidiche di allergeni differenti appartenenti alla famiglia delle proteine ns-LTPs, e che tali sequenze sono prive di uno o più dei quattro ponti disolfuro presenti nella sequenza degli allergene in forma selvatica.
2. Proteina di fusione secondo la rivendicazione 1 caratterizzata dal fatto che le sequenze aminoacidiche sono prive di almeno un ponte disolfuro nella regione ammino terminale compresa tra i residui d'amino acidi 1 e 30.
3. Proteina di fusione secondo una qualsiasi delle rivendicazione 1 a 2 caratterizzata dal fatto che la sequenza aminoacidica di ognuno degli allergene è indipendentemente mutata per eliminazione o per sostituzione di uno o più residui di cisteina coinvolti nella formazione di un ponte disolfuro.
4. Proteina di fusione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 o 3 caratterizzata dal fatto che le sequenze aminoacidiche modificate mantengono essenzialmente la stessa

lunghezza delle sequenze degli allergeni in forma selvatica.

5. Proteina di fusione secondo la rivendicazione 1 o 4 caratterizzata dal fatto che gli allergeni sono prodotti da piante appartenenti allo stesso genere, ovvero alla stessa specie, ovvero alla stessa varietà vegetale.
6. Proteina di fusione secondo la rivendicazione 1 o 5 caratterizzata dal fatto d'essere una proteina eterodimera che comprende le sequenze amino acidiche di due differenti allergeni.
7. Proteina di fusione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6 caratterizzata dal fatto che comprende gli allergeni Parj1 e Parj2 della specie *Parietaria Judaica*.
8. Proteina di fusione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7 caratterizzata dal fatto che la sequenza aminoacidica di ognuno degli allergeni è indipendentemente mutata per eliminazione o per sostituzione di uno o più residui di cisteina nelle posizioni corrispondenti alle posizioni 4, 14, 29, 30, 50, 52, 75 e 91 della sequenza amino acidica dell'allergene Parj1 e/o Parj2.



14. Cellula ospite trasformata per mezzo del sistema di espressione o di clonaggio secondo la rivendicazione 13.
15. Proteina di fusione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10 per uso in un metodo di trattamento medico terapeutico o diagnostico.
16. Proteina di fusione secondo la rivendicazione 15 per uso come agente immunologico ipoallergenico nel trattamento di allergie in immunoterapia specifica (SIT).
17. Proteina di fusione secondo la rivendicazione 15 per uso nel trattamento di rinite, congiuntivite, orticaria, angioedema, aczema, dermatiti, asma, shock anafilattico.
18. Composizione farmaceutica comprendente la proteina di fusione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10 ed un eccipiente farmacologicamente accettabile.
19. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 18 in forma di soluzione, sospensione, emulsione, crema, unguento o inserto.
20. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 18 per una somministrazione

9. Proteina di fusione eterodimera secondo una qualsiasi delle rivendicazione 1 a 8 caratterizzata dal fatto che contiene le sequenze amino acidiche degli allergeni Parj1 e Parj2 ambedue indipendentemente modificate per sostituzione di residui di cisteina con residui di Asn, Ser, Thr, Ile, Met, Gly, Ala, Val, Gln o Leu nelle posizioni 29 e 30 ovvero 4, 29 e 30 ovvero 29, 30, 50, 52.
10. Proteina di fusione eterodimera secondo la rivendicazione 9 avente sequenza amino acidica SEQ ID NO: 4.
11. Sequenza nucleotidica comprendente il DNA codificante la proteina di fusione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10.
12. Sequenza nucleotidica secondo la rivendicazione 11 comprendente la sequenza nucleotidica SEQ ID NO: 3.
13. Sistema d'espressione o di clonaggio comprendente la sequenza nucleotidica secondo le rivendicazioni 11 o 12 affiancato da opportune sequenze di controllo, promozione e regolazione dell'espressione.

parenterale, sottocutanea, intramuscolare, intravenosa, topica, orale o per inserzione sottocuteanea.

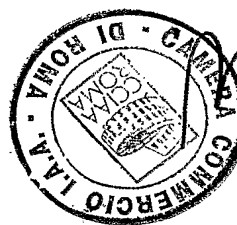
21. Metodo di preparazione della proteina di fusione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10 caratterizzato dal fatto che sequenze ammino acidiche opportunamente mutate di allergeni differenti sono prodotte e legate direttamente o attraverso uno spaziatore per sintesi chimica o per espressione, in forma di proteina di fusione, in cellule ospiti geneticamente modificate.
22. Metodo di preparazione secondo la rivendicazioni 21 caratterizzato dal fatto che cellule ospiti sono trasformate con un vettore di espressione che comprende il DNA codificante le sequenze amino acidiche in forma fusa, mutate attraverso mutagenesi sito-specifica in codoni codificanti residui di cisteina.
23. Metodo di preparazione secondo la rivendicazioni 22 caratterizzato dal fatto che uno o più residui di cisteina sono sostituiti da residui di Asn, Ser, Thr, Ile, Met, Gly, Ala, Val, Gln o Leu.

24. Metodo di preparazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 21 a 23 caratterizzato dal fatto che uno o più residui di cisteina in posizione 29, 30 ovvero 4, 29, 30 ovvero 29, 30, 50, 52 sono sostituiti da residui di alanina o serina.
25. Metodo di preparazione di una composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 18 a 20 caratterizzato dal fatto che la proteina eterodimera è miscelata in quantità immunologicamente attiva con un eccipiente farmacologicamente accettabile.

p.p. Consiglio Nazionale delle Ricerche

Dott. Claudio Germinario
(scr. Albo n° 989-B)

C. Germinario



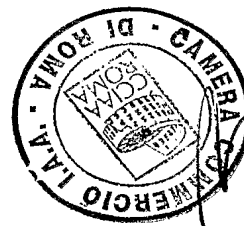
LM 2004 A 000103

g aggaggctAg cgggaaagtg gtgcaggata taatgccgtg cctgcatttc
gtgaaggggg aggagaagga gccgtcgaag gagAgcAgca gcggcacgaa gaagctgagc
gaggaggtga agacgacgga gcagaagagg gaggcctgca agtgcatagt gcgcgccacg
aagggcatct ccggtatcaa aaatgaactt gtcgccgagg tccccaaagaa gtgcgatatt
aagaccactc tcccgcccat caccgccgac ttcgactgct ccaagatcca aagtactatt
ttcagaggtt actat

GGATTC

caag aaaccAgcgg gactatggtg agagcgtga tgccgtgcct gccgttcgtg
caggggaaaag agaaagagcc gtcaaagggg AgcAgcagcg gcgcaaaaag attggacggg
gagacgaaga cggggccgca gagggtgcac gcttgtgagt gcatccagac cgccatgaag
acttattccg acatcgacgg gaaactcgtc agcgagggtcc ccaagcactg cggcatcggt
gacagcaagc tcccgcccat tgacgtcaac atggactgca agacagttgg agtggttcct
cggcaacccc aacttccagt ctctctccgt catggtcccc tcacggggccc aagtgatccc
gcccacaaag cacggttgga gagaccccag attagagttc cgccccccgc accggaaaaa
gcc TAA

Fig. 1



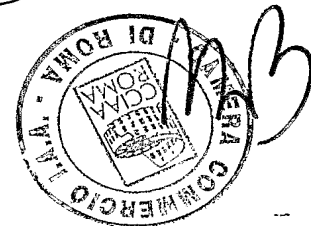
e. Germinario
Dott. Claudio Germinario
(Iscr. Albo n° 989 B)

EM 2004 A 000103

1	EEA <u>SG</u> KVVQD IMPCLHFKVG EEKEPSKE <u>SS</u> SGTKKLSEEV KTTEQKREAC	50
51	KCIVRATKGI SGIKNELVAE VPKKCDIKTT LPPITADFDC SKIQSTIFRG	100
101	YY <u>GF</u> QET <u>S</u> GT MVRALMPCLP FVQGKEKEPS KG <u>SS</u> SGAKRL DGETKTGPQR	150
151	VHACECIQTA MKTYSDIDGK LVSEVPKHCG IVDSKLPPID VNMDCKTVGV	200
201	VPRQPQLPVS LRHGPVTGPS DPAHKARLER PQIRVPPAP EKA	243

Fig.2

C. Germinario
Dot. Claudio Germinario
(Iscr. Albo n° 989 B)



RM 2004 A 000103

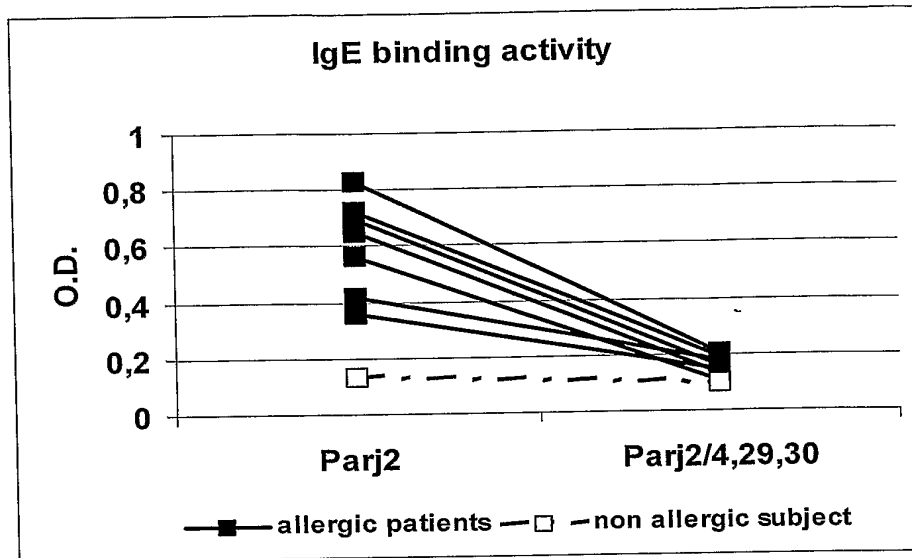
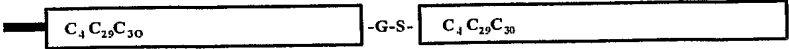


Fig. 3

C. Germinario
Dr. Claudio Germinario
(Iscr. Albo n° 969 B)



RM 2004 A 000103

A  PjEDcys

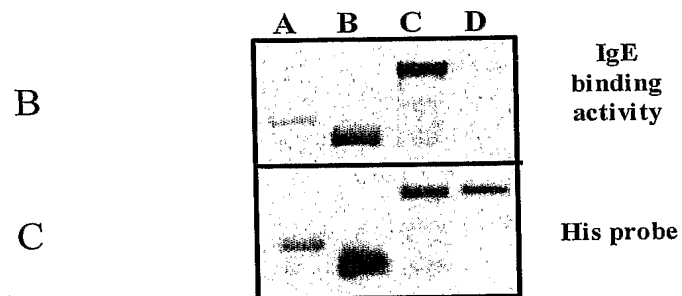
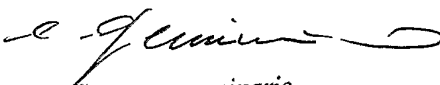
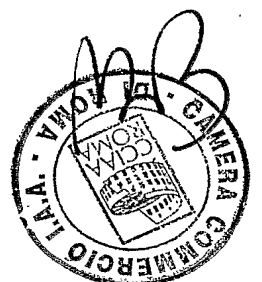


Fig 4




E. G. L. Minerva
Iscr. Albo n° 989 B1



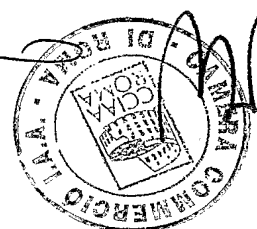
FM 2004 A 000103

Inibizione del legame ELISA

	Dimero W.T	PjEDcys
Paziente 1	68%	7%
Paziente 2	56%	3,5%
Paziente 3	62%	10%
Paziente 4	62%	8%
Paziente 5	62%	8%

Fig. 5

C. Germinario
Dott. Claudio Germinario
(Isr. Albo n° 989 B)



RM 2004 A 000103

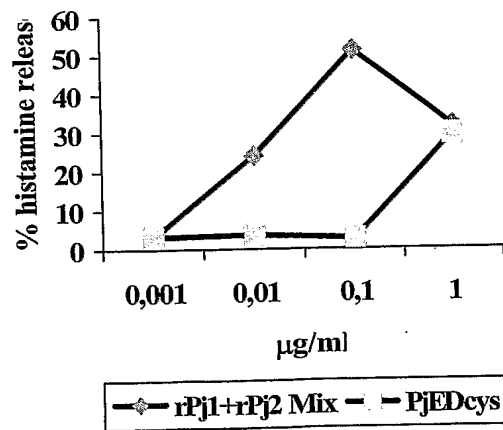
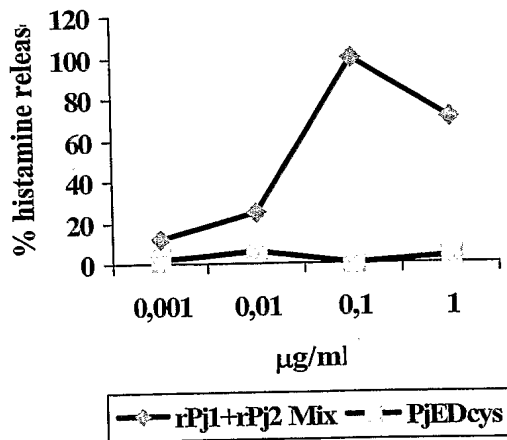
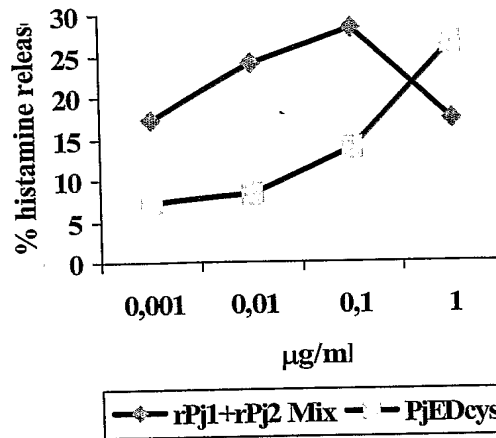
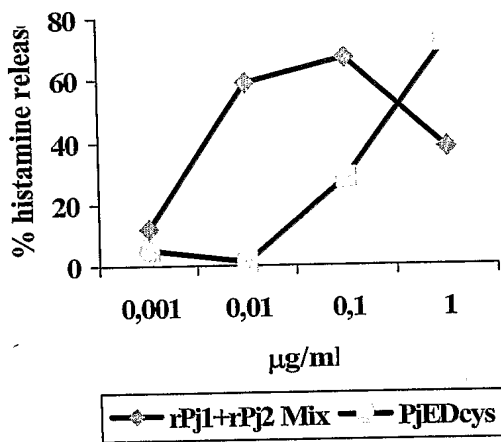
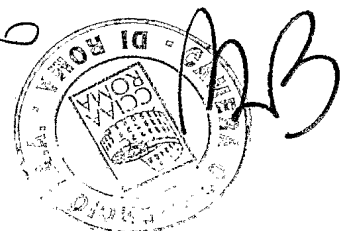
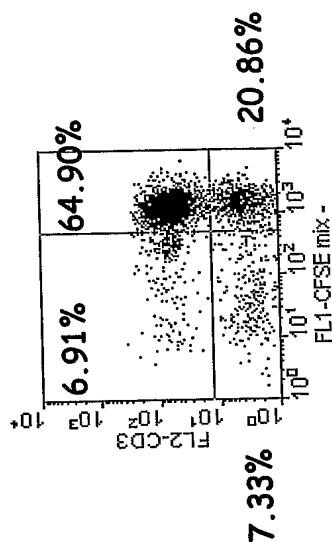


Fig. 6

-e-germinario
Dott. Claudio Germinario
(Iscr. Albo n° 989 B)

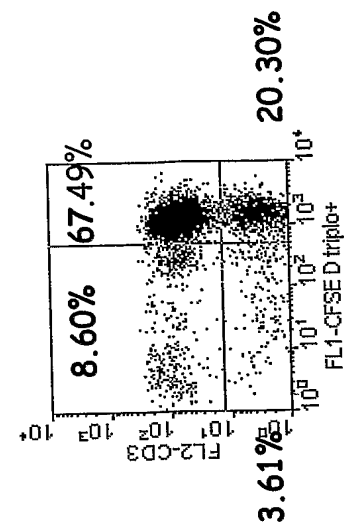


Par j 1



B

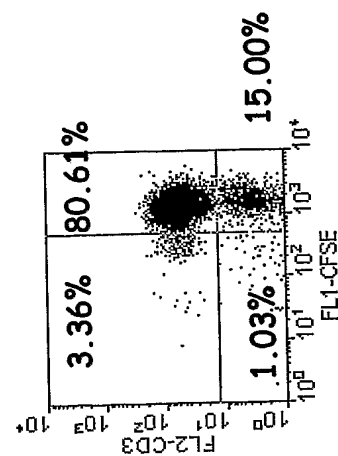
PJEDcys



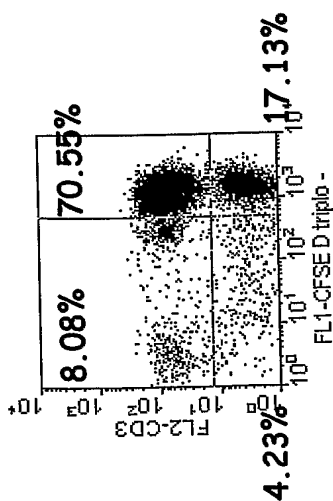
D

10µg/ml

Medium



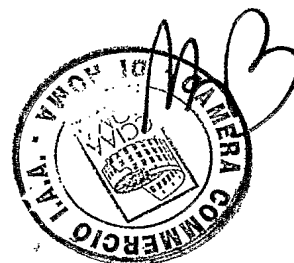
A



C

2µg/ml

Fig.7



Dott. Claudio Germinario
(Iscr. Albo n° 989 B)

C. Germinario

RM 2004 A 000103

% di inibizione del
legame con le IgE
umane

P.judaica extract	ExPj	rParj1	rParj2	rParj1 rParj2
Patient 1	94	10	80	80
Patient 2	93	53	74	74
Patient 3	90	35	37	80
Patient 4	98	59	85	86
Patient 5	100	57	29	67
Patient 6	91	29	65	69
Patient 7	94	38	58	79
Media	94,3	40,1	61,1	76,5

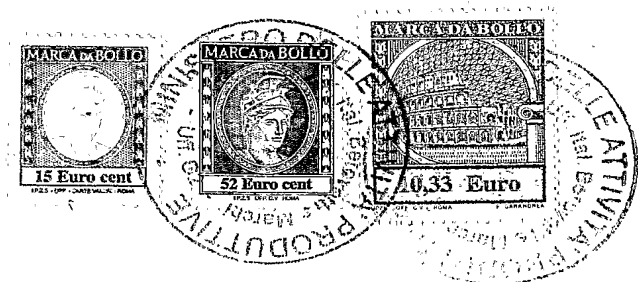


Fig. 8

Handwritten signature
Doil. *Handwritten text*
(Isr. Albo n° 989 B)

